Universidade de São Paulo

Instituto de Psicologia

Programa de Neurociências e Comportamento

Valéria Mendes da Rocha

Efeitos da cúrcuma na recuperação funcional após hemissecção medular

São Paulo

2017

Universidade de São Paulo

Instituto de Psicologia

Programa de Neurociências e Comportamento

Valéria Mendes da Rocha

Efeitos da cúrcuma na recuperação funcional aguda após hemissecção medular

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Michele Schultz

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste
trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes da Rocha, Valéria
Efeitos da cúrcuma na recuperação funcional após hemissecção medular / Valéria Mendes da Rocha; orientador Michele Schultz. -- São Paulo, 2017.
58 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017.

1. lesão medular. 2. ratos. 3. recuperação. 4. plasticidade. I. Schultz, Michele, orient. II. Título.

ROCHA, V.M. **Efeitos da cúrcuma na recuperação funcional após hemissecção medular**. Dissertação apresentada ao Programa de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 22 de setembro de 2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Valmir e Ana Lucia, que são meus amores maiores, melhor exemplo de luta e maior orgulho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer meus pais, que mesmo no silêncio sempre me dão todo suporte e incentivo. Mesmo com a vida inteira, nunca vou poder retribuir o tanto que fizeram por mim por mais que tente.

À Profa. Dra. Michele Schultz, que de forma tão paciente, ajudou-me a dar cada passo desde o início da vida científica. Por todas as horas, conselhos, trabalhos em equipe, por sempre acreditar e pelo maior exemplo de manter-se humildade independente de onde chegar. Por além de ser uma ótima profissional nunca deixou de ser um excelente ser humano.

Aos meus queridos irmãos, Elaine e Álvaro, e seus cônjuges Fábio e Ana, dentre tantas coisas, por me proporcionarem as cinco formas de amor mais puro e verdadeiro (Victor, Livia, Luigi, Murilo e Laura). E por tê-los, não só como irmãos, mas como grandes amigos que possa contar a qualquer momento.

Aos meus queridos pacientes, que foram a grande inspiração. Sempre solícitos a me ajudar com todas as trocas de horário, atrasos e cancelamentos. Sempre me incentivando e torcendo em cada degrau.

Aos meus amigos, que viveram esse mestrado junto comigo, sofrendo com cada fracasso e aprendendo cada técnica de laboratório/matéria. A vocês, minha eterna gratidão.

Contemplando os amigos, gostaria de fazer um agradecimento especial à Raila e Valéria que mesmo com à distância física me auxiliaram com seu apoio, ouvido amigo e incentivo contínuo.

Ao GENAF, que me acolheu desde o início e proporcionou milhares de trocas enriquecedoras. Pela dinâmica de grupo partilhada da melhor forma possível dentro de nossas limitações, mas com muito empenho e um verdadeiro trabalho em equipe. E agradecimento especial à Nádia Baccio, Willian Shimizu e Daiane Fontes por todo papel que tiveram nas várias etapas.

À Prof Fabiana Evagelista e seus alunos Cynthia Muller, Ana Laura e Bruno Vecchiato pelo conhecimento partilhado e auxílio nas práticas de laboratório.

Ao NEC por me proporcionar recursos financeiros para atividades extracurriculares.

À secretária do IP, com a querida Sônia que mesmo fora de sua função sempre tentava nos auxiliar a sair com respostas e resoluções das dúvidas burocráticas.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

E finalmente, à Deus por manter-me saudável e por todas essas pessoas do caminho, situações e melhores aprendizados nessa jornada.

Esta dissertação, na data expressa na publicação, está em vigor com as seguintes normas:

Adaptado da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnica), NBR 6023.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP : documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP ; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora [et al.]. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2009. 102 p. (Cadernos de Estudos; 9).

RESUMO

ROCHA, V.M. **Efeitos da cúrcuma na recuperação funcional após hemissecção medular**.

A lesão medular é uma injúria do sistema nervoso central que resulta em grande déficit funcional. É uma condição relacionada ao desenvolvimento industrial e tecnológico e acomete principalmente adultos jovens em idade produtiva. Apesar de algumas tentativas terapêuticas estarem sob investigação, ainda não há tratamento eficaz que garanta recuperação funcional. A maioria das estratégias utilizadas visa estimular eventos de neuroplasticidade. A cúrcuma é um composto dietético que tem potencial terapêutico por interferir em processos inflamatórios, oxidativos e imunológicos. O presente estudo investigou possíveis efeitos terapêuticos da cúrcuma após hemissecção medular em ratos. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Os animais foram submetidos à hemissecção medular após a medula espinhal ser exposta por laminectomia. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: i) lesionado com cúrcuma (LC); ii) lesionado sem tratamento (LS). Os testes comportamentais BBB Score, Combined Behavior Score, plano inclinado e Beam Walking foram realizados 24h, 72h e 7 dias depois da lesão para avaliar o reaprendizado medular e a recuperação funcional. Os resultados demonstraram melhora do comportamento sensitivo-motor dos animais, provavelmente envolvendo neuroproteção das vias de tato, dor e pressão. As propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da cúrcuma podem ter levado à melhora funcional. Análises celulares e moleculares são necessárias para entendermos melhor os efeitos no epicentro da lesão depois do tratamento com a cúrcuma. Um dos possíveis efeitos prováveis é sobre a conversão de alguns ácidos graxos envolvidos na inflamação, como o ácido araquidônico, diminuindo sua ação e gerando ganhos funcionais. O uso da cúrcuma na fase aguda da hemissecção medular interferiu positivamente na recuperação sensitivo-motora deflagrando, portanto, eventos de neuroproteção e neuroplasticidade.

Palavras-chave: lesão medular, cúrcuma, neuroproteção, neuroplasticidade

ABSTRACT

ROCHA, V.M. **Effects of curcumin on functional recovery after medular hemisection.**

The spinal cord injury is a condition that results in severe functional deficit. It is related to the industrial and technological development and affects mainly young adults. Despite some therapeutic trials are under investigation, there is no treatment that guarantees functional recovery. Most of those strategies for recovery involve neuroplasticity. Curcumin is a dietetic compound with known therapeutic potential, interfering on inflammatory, oxidative and immunological processes. The present study investigated the effects of the treatment with curcumin on acute phase of spinal cord hemi-section in rats. The protocol has been approved by Ethics Committee of School of Arts, Sciences and Humanities. The animals were submitted to hemi-section after laminectomy and were divided in two groups: i) injured with curcumin (LC); ii) injured without treatment (LS). The following behavioral tests were performed 24h, 72h and 7 days after lesion: BBB Score, Combined Behavior Score, inclined plane and Beam Walking test aiming to evaluate medular relearning and functional recovery. The tests indicated an improvement of the sensitive-motor behavior probably by neuroprotection of tactile, pain and pressure pathways. The anti antiinflammatory and antioxidant properties of curcumin could result in functional improvement. Cellular and molecular analysis are necessary to better understand the effects could be over the conversion of some fatty acids involved on inflammation, such as arachidonic acid, reducing its action and promoting functional gain. The use of curcumin in the acute phase of spinal cord hemi-section seems to interfere positively in sensorial-motor recovery triggering neuroprotection and plasticity.

Key words: spinal cord injury, curcumin, neuroprotection, neuroplasticity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
1.1 Plasticidade da medula espinhal 13
1.2 Medula espinhal após lesão 15
1.3 Mecanismos de recuperação morfológica da medula 16
1.4 Cúrcuma como agente terapêutico 17
2 OBJETIVO 22
3. MATERIAIS E MÉTODOS 22
3.1 Desenho experimental 23
3.2 Lesão medular 23
3.3 Tratamento com cúrcuma 24
3.4 Análises do comportamento sensório-motor 25
3.5 Eutanásia 32
3.6 Análise estatística 32
4 RESULTADOS 33
5. DISCUSSÃO 46
6. CONCLUSÃO 52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

1. INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) é classificada como qualquer lesão ocorrida no canal medular que pode resultar em alterações da motricidade, sensibilidade, distúrbios neurovegetativos, alterações esfincterianas e ainda repercussões psicossociais. Considerando fatores adicionais à classificação da lesão podemos citar o uso da classificação da American Spinal Injury Association (ASIA) para classificação das lesões completas e incompletas em humanos de acordo com os sintomas apresentados pelos pacientes. A LM pode gerar paralisia ou paresia, alteração do tônus muscular, alterações nos reflexos superficiais e profundos, alteração ou perda das diferentes sensibilidades, perda do controle esfincteriano, disfunção sexual e alterações autonômicas (Ministério da Saúde, 2013).

Nos Estados Unidos há cerca de 57 casos por milhão, ou seja, 17 mil novos casos a cada ano; além do número estimado de 314 mil pessoas que já têm esse tipo de lesão no país, não sendo incluídos casos em que o acidente foi fatal (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2016). O coeficiente de incidência no Brasil é desconhecido por não existirem dados precisos, porém estima-se que haja 10 mil novos casos anualmente (Ministério da Saúde, 2013).

O tratamento da medula espinhal (ME) após lesão é um desafio para a neurociência, considerando que estudos recentes demonstram que é necessária a conjunção de diferentes estratégias para obter resultados de recuperação funcional (Houlé et al, 2013).

1.1 Plasticidade da medula espinhal

A ME é dotada de mecanismos que se caracterizam como eventos de plasticidade. Dentre esses, há destaque para o mecanismo envolvido na geração de padrões rítmicos de movimentos, comandado pelo sistema suprassegmentar que, integrado aos interneurônios medulares e sistema sensorial, ativa e reorganiza a atividade motora dos membros. O padrão rítmico se estabelece a partir das informações sensitivas recebidas do ambiente e a resposta locomotora esperada, auxiliando nos ajustes posturais. Há uma rede neuronal presente na ME, conhecida como Centro Gerador de Padrão (CPG), responsável pelo controle e ativação de determinados padrões rítmicos (Ekman,2004).

Padrões esses que geram respostas do tipo “feedback/feedforward”, ativando grupos musculares antagônicos, caracterizado por padrões de ativação alternados, em que quando houver a contração dos flexores, interneurônios estarão necessariamente ativando padrões extensores do lado contralateral, como representado no esquema da Figura 1. Quando há uma interrupção nas vias suprassegmentares, limitando a comunicação entre a região central com a ME como no caso das LMs, há evidências da existência de automaticidade motora, como também um alto nível de adaptação e plasticidade, demonstrando a possibilidade de recuperação de reflexos funcionais e respostas locomotoras (Golubitsky et al, 1999; Gulino et al., 2007; Roy et al., 2012; Takiguchi et al.,2015).

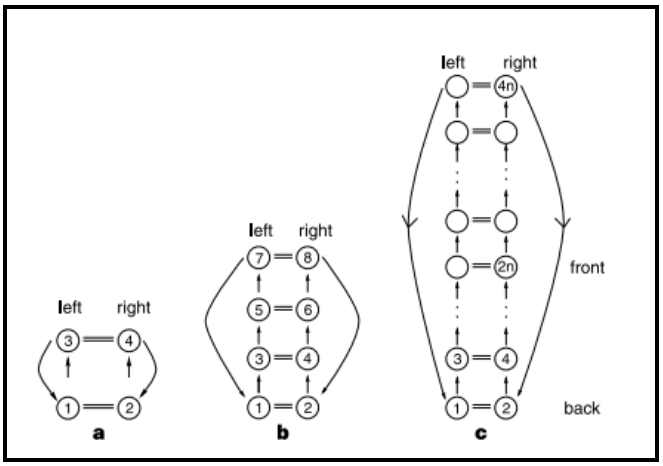

Figura 1. Esquema da rede do centro gerador de padrão (CPG). (a) rede neural de quatro células para o CPG para locomoção bipedal; (b) oito células para quadrúpedes; (c) rede 4n células para animais com 2n patas. Linhas duplas indicam acoplamento contralateral; linhas únicas indicam acoplamento unilateral. Direção do acoplamento ipsilateral é indicado por flechas; acoplamento contralaterais é bidirecional (FONTE: Golubitsky et al,1999).

Há também na ME, outro tipo de plasticidade sináptica definida por alterações moleculares envolvidas com os receptores NMDA e AMPA , que serão de insuma importância na consolidação de memórias (Lent, 2010; Vaziri et al, 2015). Sendo que o BDNF está relacionado aos processos da LTP, aprendizagem e memória. O hipocampo é uma estrutura intimamente envolvida nos processos de aprendizagem e consolidação da memória, o BDNF é um importante regulador dos processos de regulação e sobrevivência dos neurônios dessa estrutura. Recebendo íntima influencia do CREB e CaMKII para a síntese do BDNF portanto envolvidos nos mecanismos relacionados a processos de aprendizado e memória (Pinilla et al., 2007; Wu et al., 2011;Joseph et al., 2012; Sheikhzadeh et al., 2015).

A CaMKII contribui para potencialização de longo prazo das fibras C e formas de sensibilização central em modelos de ratos para dor neuropática. Proteínas quinase intracelulares, incluindo a CaMKII, são capazes de ativar a adenosina monofosfato cíclica fosforilada (cAMP), responsável pelo elemento de resposta da proteína (CREB) no corno dorsal espinhal. A CREB, por sua vez, pode iniciar a

transcrição dos genes e, sua translação, pode estar intimamente relacionada aos processos de plasticidade sináptica (Wang et al., 2010).

1.2 Medula espinhal após lesão

A LM traumática é tipo de lesão da ME mais comum. Além do trauma mecânico primário na medula espinhal seccionando axônios, há rompimento de vasos sanguíneos e da membrana celular. Há um processo em cascata que leva à lesão secundária progressiva que pode acarretar em edema, isquemia, inflamação, formação de citocinas, eventos relacionados a estresse oxidativo e formação de cicatriz glial, que poderão causar uma necrose irreversível no tecido e a morte neuronal. Tais eventos, por terem progressão temporal, podem ser alvo de propostas terapêuticas (Huang et al., 2007; Lin et al., 2011; Ormond et al., 2014).

Atualmente se considera que, recobrindo a ME, exista uma barreira hemato-medular (do inglês *Blood Spinal Cord Barrier* – BSCB) com características similares da barreira hemato-encefálica (BHE). Entre a BHE e a BSCB há diferenças estruturais, como as células endoteliais, que levam a diferenças fisiológicas. O aumento da permeabilidade da membrana da BSCB em relação à BHE e a presença de depósito de glicogênio nos microvasos são algumas das diferenças observadas. O aumento da permeabilidade está relacionado com mecanismos celulares e moleculares, como a ruptura da membrana perivascular, que facilita a expansão da lesão secundária. Além das alterações morfológicas como o aumento do transporte vesicular através do epitélio e o alargamento das junções celulares entre as células endoteliais (Bartanusz el al, 2011).

Considerando respostas celulares e moleculares relacionadas à LM traumática, podemos dividir as fases clínicas em aguda e crônica, sendo que cada qual exige

uma abordagem terapêutica adequada. A fase aguda acontece cerca de 2 a 48 h após a lesão e pode ter início no epicentro da medula, com hemorragia e necrose, e seus efeitos podem influenciar todo processo de recuperação. Por essa razão, ao investigarmos estratégias terapêuticas, precisamos buscar tanto na fisiopatologia da LM como na utilização de agentes bioquímicos, intervenções para minimizar esses efeitos e favorecer a recuperação morfológica e funcional (Souza et al., 2009; Marcos et al., 2015).

Como efeito negativo principal às células na lesão secundária da LM, ocorre a liberação de radicais livres que atacam a membrana celular e este mecanismo, por sua vez, altera os componentes celulares incluindo os ácidos graxos insaturados pelo processo de peroxidação lipídica (Huang et al., 2007; Cemil et al., 2010).

Visando estabelecer formas para atenuar os danos desencadeados pela lesão secundária, favorecer neuroproteção e potencializar eventos relacionados à neuroplasticidade, novas estratégias terapêuticas não farmacológicas e não invasivas estão sendo estudadas, como a administração de dietas a base cúrcuma (Joseph et al., 2012).

1.3 Mecanismos de recuperação morfológica da medula

O BDNF está relacionado aos processos da potenciação de longo prazo (LTP), aprendizagem e memória. Considerando que o hipocampo é uma estrutura intimamente envolvida nos processos de aprendizagem e memória, o BDNF tem um importante papel como regulador dos processos de regulação e sobrevivência dos neurônios do hipocampo. CREB e CaMKII estão envolvidas nos mecanismos relacionados a processos de aprendizado e memória (Pinilla et al., 2007; Wu et al., 2011;Joseph et al., 2012; Sheikhzadeh et al., 2015).

A CaMKII contribui para potencialização de longo prazo das fibras C e formas de sensibilização central em modelos de ratos para dor neuropática. Proteínas quinase intracelulares, incluindo a CaMKII, são capazes de ativar a adenosina monofosfato cíclica fosforilada (cAMP), responsável pelo elemento de resposta da proteína (CREB) no corno dorsal espinhal. A CREB, por sua vez, pode iniciar a transcrição dos genes e, pode estar intimamente relacionada aos processos de plasticidade sináptica (Wang et al., 2010).

Quando abordamos eventos de plasticidade, fatores neurotróficos (FTNs) desempenham papel fundamental desse processo. O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), juntamente com fator de crescimento neural (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) , fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator de crescimento do fibroblasto (FGF) fazem parte de biomoléculas envolvidas nas alterações morfológicas ocorridas no tecido nervoso submetido a um estímulo (Santos et al, . Nesse trabalho focaremos em estímulos que geram interrupções das continuidades nervosas causadas por lesões ocorridas ao tecido, que acarretará no aumento da secreção das FNTs, importantes na recuperação/plasticidade das LMs

1.4 Cúrcuma como agente terapêutico

A cúrcuma é uma especiaria utilizada em muitos alimentos como curry, mostarda e batatas fritas e também em cosméticos e fármacos. Por possuir um pigmento natural é utlizado como agente colorimétrico, proporcionando uma coloração amarela aos mesmos (Tomita et al., 2005; Cemil el al.,2010; Wu et al, 2011). Isolada do rizoma (caule da planta) da cúrcuma longa, vem dos pigmentos polifenólicos conhecidos como curcuminóides que são principalmente compostos por

cúrcuma (~77%), demetoxicurcumina (~17%) e bisdemetoxicurcumina (~3%). A cúrcuma é que apresenta mais atividade dentre a composição (Aydin el al,2017). Dentre as quais uma variedade de ações terapêuticas, incluindo ações anti-inflamatórias, anti-infecciosas, anti-oxidantes e anticancerígenas (Cemil et al., 2010;Wu et al., 2011;Lin et al ., 2011; Koizumi et al., 2011). Possui efeitos vasculares uma vez que leva à melhora na reperfusão pós lesão isquêmica do miocárdio, fígado, rim, cérebro e outros órgãos e sistemas (Cemil et al., 2010).

Assim, tal como outros componentes naturais, entre eles, cafeína, resveratrol e ácido rosmarínico, a cúrcuma possui propriedades antioxidantes que podem diminuir a produção de radicais livres e melhorar a viabilidade sobre condições de estresse oxidativo (Tomita el al, 2005).

Os efeitos do uso da cúrcuma também estão relacionados à modulação da ação do fator neurotrófico derivado do cerébro (BDNF- *braind derived neurotrophic factor*; Joseph et al., 2012), que é um facilitador sináptico e excitador neuronal por promover a fosforilação da sintaxina-1, envolvida na liberação de neurotransmissores, no elongamento axonal e na manutenção de contatos sinápticos, bem como influencia a ação do fator de transcrição CREB e da proteína quinase ativada por cálcio/calmodulina II (CaMK II).

Os efeitos da cúrcuma na imunomodulação e como agente antioxidante, leva-nos a crer que o composto possa ser utilizado no tratamento de doenças ou afecções neurológicas caracterizadas por inflamação. A presença de cúrcuma, p.e., inibe a produção de proteína inflamatória macrofágica que, quando produzida, gera um processo inflamatório no sistema nervoso. A cúrcuma pode suprimir cascatas de sinalização inflamatórias, dependendo do tipo de célula e estímulo proporcionado. A

diminuição de neutrófilos circulantes no período pós-lesão pode diminuir as consequências negativas causadas pela cascata inflamatória (Tomita et al., 2005).

No tratamento com agentes nutricionais, deve ser considerada a metabolização do composto, afinal, a cadeia metabólica determinará o mecanismo ação. Doses orais de 500 mg/kg de cúrcuma foram utilizadas para proporcionar uma concentração no plasma de 1,8 ng/ml. Para neuropatia periférica, uma dose de 200 mg/kg utilizada desencadeou como resposta uma hiperalgesia térmica. Por outro lado, doses de 3,6 g diminuíram a produção de prostaglandinas, sinalizadoras inflamatórias derivadas do ácido araquidônico (AA), em até 60% (Tomita et al., 2005; Xie et al.,2011; Agthong et al.,2015).

O AA é um ácido graxo envolvido na cascata inflamatória e sua principal fonte é a hidrólise através da fosfolipase secretora. Há outra fonte de formação do AA que é a metabolização lipídica pela cicloxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX). A metabolização desse ácido graxo pode influenciar em mediadores lipídicos. A produção de mediadores químicos como prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas estão intimamente relacionados com o AA, tendo forte influência sobre os processos inflamatórios. Por essa razão, a modulação da produção do AA através do uso de compostos dietéticos que podem influenciar sua metabolização pode resultar, consequentemente, em possíveis efeitos sobre o processo inflamatório (Ahmad et al., 2014).

Os efeitos da cúrcuma sobre a inflamação ocorrem por influenciar o metabolismo do ácido araquidônico, a atividade de enzimas como a COX, a pró inflamação química, a indução do óxido nítrico (iNOS), a ação de proteínas quinases, os fatores de transcrição e a liberação de esteroides, proporcionando a

diminuição das cascatas inflamatórias pós-lesão (Xie et al.,2011; Ahmad et al., 2014).

O uso da cúrcuma pode também influenciar a conversão do ácido linolênico (ALA), que é adquirido através da ingestão e, quando absorvido pelo intestino e sintetizado no fígado através de uma cascata de enzimas localizadas no retículo endoplasmático, facilitam a biossíntese do ácido docosahexaenoico (DHA). O DHA é um ácido graxo que pertence à família do ômega 3, tendo importante função nos sistemas moleculares específicos, como na comunicação das células, plasticidade sináptica e aprendizado relacionado ao hipocampo. O DHA também influencia a redução do processo inflamatório e promove material estrutural para as membranas plasmáticas, tendo um efeito sobre a função neuronal como um todo (Astarita et al., 2011; Holly et al 2012; Ormond et al, 2014).

Considerando a possibilidade de que a cúrcuma pode influenciar mecanismos de plasticidade relacionados à CPG na ME por interferir na lesão secundária, seja por diminuir a inflamação ou potencializar ações neurotróficas mediadas pelo BDNF, consideramos que o tratamento com esse composto possa ser uma importante intervenção não farmacológica para tratamento da LM.

É inegável a capacidade de neuroplasticidade na medula espinhal, uma vez que há aprendizado e memória que garantem padrões de movimento. Portanto, estratégias terapêuticas que potencializem essa capacidade podem se um recurso auxiliar para recuperação funcional no caso de uma LM traumática.

Como a cúrcuma é um potente anti-inflamatório que auxiliará na diminuição dos efeitos causados pela cascata inflamatória, como por exemplo, a cicatriz glial que, numa última fase da recuperação da ME, prejudicaria na plasticidade por sua característica não funcional.

A suplementação com cúrcuma tem se mostrado eficaz no tratamento de desordens do sistema nervoso central. Porém, estudos que demonstrem os efeitos da suplementação sobre a medula espinhal lesada são insipientes. Considerando que esses dois componentes têm influência sobre o BDNF, importante no metabolismo do sistema nervoso como um todo, parece-nos que a suplementação pode resultar em efeitos terapêuticos e, portanto, análises mais detalhadas sobre os mecanismos seriam de grande contribuição.

2 OBJETIVO

Analisar efeitos da cúrcuma na recuperação da atividade sensório-motora, após hemissecção medular.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a função motora na fase aguda e subaguda da lesão medular;

Avaliar os reflexos de retirada, pressão e dor na fase aguda e sabaguda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Os procedimentos aos quais os animais foram submetidos foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP (protocolo número 001/2015).

Foram utilizados 16 ratos Wistar machos, adultos, com peso entre 300 a 400 g. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas, alimentação *ad libitum,* com ciclo dia/noite de 12h/12h, sendo que o ciclo claro se iniciava às 7h da manhã.

Os animais tinham 3 meses de idade e foram alojados em grupos de 3 a 4 animais em gaiolas com dimensões de 31 cm de largura, 46 cm de comprimento e 16 cm de altura, recebendo água filtrada e a ração *ad libitum*.

3.2 Lesão medular

Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para realização da lesão medular, recebendo anestesia generalizada contendo 80 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilasina. Após avaliar a sensibilidade, que consistiu em testar reflexo palpebral e de retirada para confirmar se os animais estavam completamente anestesiados para início do procedimento invasivo, foi feita tricotomia da região da região tóraco-lombar. Os animais foram colocados em uma superfície com isolamento de temperatura para evitar hipotermia. Realizou-se incisão mediana de pele e músculos até exposição das lâminas vertebrais. A laminectomia foi realizada entre os níveis T9-T10 até exposição da medula espinhal (Figura 2). Foi realizada

hemissecção à direita utilizando micro-tesoura oftálmica. A artéria medular posterior foi utilizada como referência. Após finalização do procedimento cirúrgico os animais foram suturados e acompanhados para recuperação da anestesia. Os animais foram divididos em 2 grupos: i) lesionado que recebeu o tratamento com cúrcuma (LC, n=10) e ii) lesionado sem tratamento (LS, n=6).

Durante o pós operatório, o esvaziamento vesical foi feito através da manobra de Credé adaptada até o restabelecimento da função da bexiga urinária.

Não foi feito uso de medicamentos antiinflamatórios adicionais para que não houvesse mascaramento dos possíveis efeitos do tratamento com os compostos dietéticos.

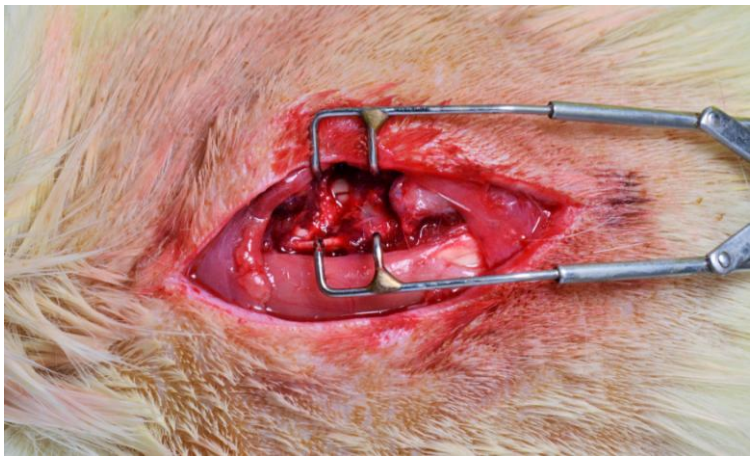

Figura 2. Laminectomia e exposição da ME para execução de hemissecção em ratos Wistar machos. A artéria medular posterior foi utilizada como referência para realização da hemisecção medular.

3.3 Tratamento com cúrcuma

Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração e água. Após 30 minutos da finalização do procedimento cirúrgico ou até que o animal apresentasse o reflexo de deglutição estabelecidos, eram administrados, através de gavagem, 200 mg/kg de cúrcuma (Agthong et al, 2015) para os animais do grupo LC, sendo mantida essa

complementação alimentar durante 7 dias, quando se realizou a eutanásia. Os animais do grupo LS receberam, através de gavagem, de 5 ml de água na mesma quantidade utilizada para diluir a cúrcuma no grupo LC.

3.4 Análises do comportamento sensório-motor

Após a hemissecção medular, foram realizados testes para a análise da função motora e sensibilidade no 1º, 3º e 7º dias do pós-operatório. Os testes realizados foram BBB, Combined Behavior Score (CBS) e Beam walking que têm seus escores muito sensíveis a respostas adquiridas no comportamento motor dos animais após lesão medular e tomou-se como referência de normalidade a movimentação normal de ratos.

Índice Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

Realizou-se o teste BBB (Basso et al., 2008 – Tabela 1), que consiste em uma avaliação feita por observador treinado para graduar diferentes aspectos do movimento do membro pélvico afetado: i) função locomotora; ii) movimento articular e apoio; iii) posicionamento da cauda e coordenação; e iv) posicionamento do tronco. A graduação do teste se baseia em todos nas dimensões citadas acima, assim, avalia-se se o animal executa as funções, tendo como base os movimentos de animais não lesionados (Figueroa et al, 2012). O teste é graduado de 0, em que não há função motora nenhuma dos membros pélvicos, a 21, na qual a função motora está normal. Os animais são avaliados em duplas para minimizar os efeitos de ansiedade dos animais, em um local que possam andar livremente e são observados por um período de 5 minutos. Caso o animal se direcione a locais

inapropriados, os mesmo podem ser levantados algumas vezes sem interferência no resultado do teste (Basso el al, 1996; Ferguson el al, 2004).

Escala BBB de taxa motora	
0	Sem movimento do membro pélvico
1	Movimento perceptível de uma ou duas articulações, geralmente quadril e/ou joelho
2	Movimento amplo de uma articulação ou movimento amplo de uma articulação e perceptível de outra
3	Movimento amplo de duas articulações
4	Movimento perceptível de todas as três articulações do membro pélvico (quadril, joelho e tornozelo)
5	Movimento perceptível das duas articulações e movimento amplo da terceira
6	Movimento amplo das duas articulações e perceptível da terceira
7	Movimento amplo das três articulações do membro pélvico
8	Arrasta sem suporte de peso ou realiza colocação plantar das dos pés sem suporte de peso
9	Colocação do membro pélvico com suporte de peso somente quando parado (em posição estática) ou com apoio dorsal e suporte de peso ocasionais, frequentes ou consistentes e sem passos com apoio plantar
10	Passos com apoio plantar e suporte de peso ocasionais, sem coordenação de membro torácico e membro pélvico (MT e MP, respectivamente)
11	Passos com apoio plantar e suporte de peso frequentes ou consistentes e sem coordenação MT-MP
12	Passos com apoio plantar e suporte de peso frequentes ou consistentes e coordenação MT-MP ocasional
13	Passos com apoio plantar e suporte de peso consistentes e coordenação MT-MP frequente
14	Passos com apoio plantar e suporte de peso consistentes, coordenação MT-MP consistentes e posição predominante da pata durante locomoção é em rotação ou passos com apoio plantar frequentes, coordenação MT-MP consistente e passos com apoio dorsal ocasionais
15	Coordenação MT-MP consistente e arrasta os dedos ao longo do passo
16	Coordenação MT-MP consistente durante a marcha e frequentemente não arrasta os dedos; a posição predominante da pata é paralela no contato inicial do passo e rodada na fase de retirada
17	Coordenação MT-MP consistente durante a marcha e frequentemente não arrasta os dedos; a posição predominante do pé é paralela no contato inicial do passo e na fase de retirada
18	Coordenação MT-MP consistente durante a marcha e consistentemente não arrasta os dedos; a posição predominante do pé no contato inicial do passo e rodada na fase de retirada
19	Coordenação MT-MP consistente durante a marcha e consistentemente não arrasta os dedos; a posição predominante do pé no contato inicial do passo e na fase de retirada e cauda para baixo parte do tempo
20	Marcha coordenada consistente, consistente não arrasta os dedos; a posição predominante do pé é paralela no contato inicial do passo e na fase de retirada mas há instabilidade tronco estável e cauda para cima consistentemente
21	Marcha coordenada consistente, consistente não arrasta os dedos; a posição predominante do pé é paralela no contato inicial do passo e na fase de retirada, tronco estável e cauda para cima consistentemente

Tabela 1. Escala preconizada por Basso, Beattie e Bresnahan (índice BBB) para a avaliação da função motora de ratos com lesão medular. A graduação da escala varia de 0 a 21 pontos, onde em zero a movimentação voluntária é nula e, em 21, o animal tem marcha normal.

CBS

Do inglês *Combined Behavioral Score*, CBS é um conjunto de testes relacionados: i) ao grau de utilização dos membros pélvicos durante a locomoção num campo aberto; ii) à determinação de quanto um animal permanece em uma máxima inclinação (plano inclinado) e iii) a testes que relacionam reflexos e

comportamento motor (Gale et al, 1985). Assim, utilizamos alguns dos testes que compõem esse escore que permitiram avaliar efeitos da cúrcuma sobre as respostas sensitivo-motoras. O teste do reflexo de retirada em resposta à temperatura não foi realizado por considerarmos que poderia causar algum dano aos animais uma vez que há alteração da resposta à temperatura com o tipo de lesão utilizada. Por isso, não realizamos a conversão dos escores em percentagem de déficit, como originalmente apresentado por Gale e colaboradores (1985).

Os testes do CBS usados para as avaliações sensitivo-motoras seguem abaixo.

a) Escala de Tarlov modificada (tabela 2; Torre e Boggan, 1980), que classifica o grau de melhora motora em ratos conforme escala apresentada a seguir.

Tarlov	
Pontos	**Comportamento**
0	Sem movimentos dos membros pélvicos, não sustenta peso
1	Raro movimento perceptível dos membros pélvicos, não sustenta peso
2	Frequente e/ou vigoroso movimento dos membros pélvicos, mas não sustenta peso
3	Pode sustentar peso e dar um ou dois passos
4	Deambula com leve déficit
5	Deambula normalmente

Tabela 2. Escola de Tarlov. O melhor nível motor é representado pela aumento da numeração na escala.

b) Reflexo de extensão dos dedos dos pés (REDP): reflexo apresentado quando retiramos o rato de forma rápida de uma superfície estável, em que há como resposta a extensão dos dedos (tabela 3).

Reflexo de extensão dos dedos dos pés (REDP)	
Pontos	**Comportamento**
0	Sem extensão dos dedos dos pés
1	Leve extensão dos dedos
2	Extensão normal dos dedos

Tabela 3. Graduação utilizada para avaliação do reflexo de extensão dos dedos. A maior numeração relacionado ao melhor nível motor.

c) Reflexo de colocação visual: inicialmente se segura o animal e o posiciona de uma forma que no campo visual seja possível observar onde se vai colocar as patas traseiras, de modo que é esperado as reações descritas na tabela 4.

Reflexo de colocação visual	
Pontos	**Comportamento**
0	Sem tentativa de colocação dos pés
1	Leve tentativa de colocação dos pés
2	Colocação dos pés

Tabela 4. Graduação utilizada para avaliação do reflexo de colocação visual. Valores proporcionalmente crescente à melhor da função.

d) Reflexo de retirada em resposta à:

- Extensão: reflexo de flexão dos membros pélvicos resultante da extensão abrupta dos membros posteriores;
- Pressão: reflexo de retirada após beliscar o pé com um prendedor de roupas. O estímulo aplicado não é suficientemente forte e prolongado para promover lesão;
- Dor: pressiona-se entre o hálux e segundo dedo dos membros pélvicos e a resposta esperada é a retirada reflexa.

Cada reflexo é codificado segundo a tabela, considerando que por questões didáticas foi invertida a ordem dos itens 2 e 3:

Reflexos de retirada	
Pontos	**Comportamento**
0	Sem retirada
1	Leve retirada
2	Reflexo de retirada hiperativo
3	Reflexo de retirada normal

Tabela 5. Graduação dos testes relacionados a melhora sensório-motora e dolorosa. Na graduação original o reflexo de retirada hiperativo é apresentado como número 3. Consideramos que a hiperreflexia é uma resposta relacionada à lesão e, portanto, deve ter graduação inferior à normal.

Os testes eram realizados bilateralmente, tendo como intenção avaliar os efeitos da lesão tanto no lado acometido como no não acometido. Assim, os lados lesionados foram considerados situações experimentais enquanto o lado intacto foi considerado situação controle.

e) Reflexo de endireitamento: posiciona-se o animal com as quatro patas para cima e se observa comportamento para retorno ao apoio sobre os membros assim que é liberado (tabela 6).

Reflexo de endireitamento	
Pontos	**Comportamento**
0	Sem tentativa de endireitar-se
1	Tentativa leve ou lenta de rolar em direção ao endireitamento
2	Reflexo de endireitamento normal

Tabela 6. Graduação utilizada para avaliação do reflexo de endireitamento**.** Valores proporcionais a melhora da função motora.

Plano inclinado

O teste é realizado utilizando um aparato que, através de uma plataforma móvel erguida numa velocidade, serve para se observar as reações de ajustes posturais do animal. Há um piso emborrachado na superfície móvel. Assim o animal é colocado com a cabeça voltada para o lado que ficara mais baixo após a elevação da plataforma e se eleva o mais rápido possível indo de zero grau até que o animal possa permanecer na posição por 5 segundos (Rivlin et al, 1977).

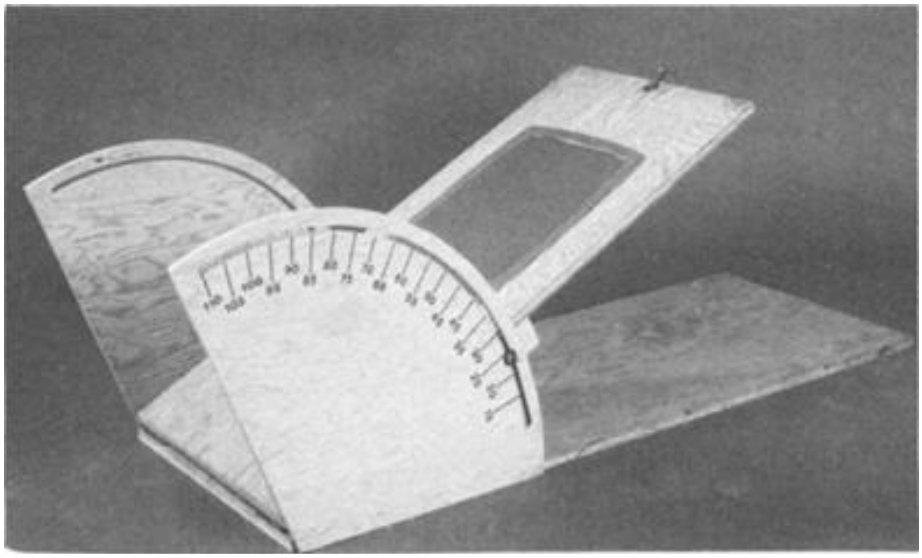

Figura 3 Aparato que apresenta uma plataforma fixa e outra móvel. A mensuração do teste é feita através da angulação que a plataforma móvel atinge sem que o animal, posicionado com a cabeça voltado para o lado que ficará mais baixo quando o dispositivo for acionado, se mantenha na posição sem cair ou deslizar pela mesma. No local em que o animal fica há uma espécie de borracha permitindo essa aderência feita pelo animal. (Rivlin et al, 1977)

Beam Walking Test

Utilizado para avaliação da melhora da função motora em lesões unilaterais de medula espinhal (Wong et al., 2012), consiste em duas plataformas separadas por uma haste de 2 metros de comprimento e 2 centímetros de largura. O animal é posicionado sobre uma extremidade e estimulado a atravessar até que chegue a plataforma do lado oposto. O animal tem 180 segundos para realizar a atividade ou seu teste é desconsiderado, sendo repetido por até três vezes em cada tempo experimental (Jeffery et al, 1997). As diferentes dimensões testadas através do aparato são transformadas em um índice, apresentado na tabela 7.

Figura 4. Beam walking apresentando 2 metros de comprimento por 2 cm, com uma plataforma no final de 10 cm x 10cm com altura de 10 cm. A altura do aparato é de 80 centímetros e foi posicionado sobre uma plataforma para que, no caso de queda do animal, não houvesse prejuízos a função motora do animal.

Beam Walking Test	
Pontos	**Comportamento**
1	Se o animal não é capaz de atravessar a trave e não é capaz de colocar o membro afetado na superfície horizontal
2	Se o animal é capaz de atravessar a trave mas foi capaz de colocar o membro afetado na superfície horizontal
3	Se atravessou a trave arrastando o membro afetado
4	Se o animal atravessou a trave e ao menos algumas vezes utilizou o membro afetado em metade do percurso
5	Se o animal atravessou a trave e ao menos utilizou o membro afetado em metade do percurso
6	Se ele atravessou a trave e usou o membro afetado para ajudar em mais de 50% dos passos ao longo do aparato
7	Se ele atravessou a trave normalmente utilizando os dois membros pélvicos e não apresentou mais que duas quedas

Tabela 7. Índice utilizado para interpretação das dimensões testadas através do Beam Walking Test. Quanto maior o número melhor a atividade foi executada pelo animal. Assim, variações da pontuação de valores menores para maiores podem significar melhora da motricidade (Frenney et al, 1982).

3.5 Eutanásia

No sétimo dia pós-lesão, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e cloridato de xilazina (50 µl/mg e 30 µl/mg, ip, respectivamente) e submetidos à decapitação.

Após eutanásia foram extraídos para análise futura por biologia molecular os seguintes tecidos: medula espinhal - epicentro lesão, adjacente sacral, adjacente cranial, cervical -, córtex motor, núcleo estriado e cerebelo.

3.6 Análise estatística

Os resultados dos testes comportamentais foram estatisticamente analisados utilizando software Prisma. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas e o pós teste Bonferroni. O índice de significância considerado foi de 95% ($p<0,05$).

4 RESULTADOS

Os dados do peso corporal dos animais foram analisados pelo teste Anova de medidas repetidas. Não houve interação entre os grupos experimentais no período estudado (F(3,42) = 1,090; p= 0,3637). Houve efeito do tratamento com cúrcuma sobre o peso ao longo do período experimental, (F(3,42) = 6.985; p= 0.006), com perda de peso após 7 dias. Apesar dos animais terem tido discreta perda do peso corporal, não houve efeito do tempo em ambos os grupos, (F(1,42)= 1.168; p= 0.2980; Figura 5).

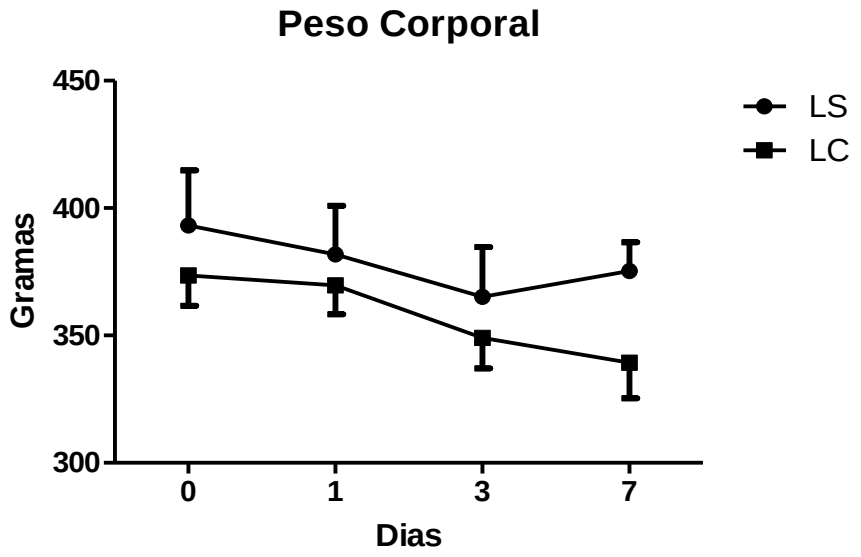

Figura 5. O gráfico mostra média±epm do peso corporal (g) dos ratos ao longo do período de tratamento nos diferentes grupos experimentais. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e hemissecção à direita. O peso foi verificado no dia 0 (quando foi feita a cirurgia) e após o procedimento cirúrgico no 1º, 3º e 7º dias. Os animais do grupo controle (LS) não receberam tratamento com cúrcuma e o grupo tratado (LC) recebeu 200mg/kg de cúrcuma 30 minutos após a cirurgia e diariamente durante todo período do experimento. A lesão interferiu no peso corporal dos animais do grupo LC no período estudado, sendo observado efeito do tempo analisado através teste ANOVA medidas repetidas e o pós teste Bonferroni (p<0,05).

No teste do BBB não houve interação entre os grupos e tempos experimentais (F (2,28) = 1,682; p = 0,2042). As lesões interferiram no teste, uma vez que houve efeito do tempo estudado (F(2,28) = 3.458; p = 0.0455), indicando que os animais tiveram uma melhora espontânea do comportamento motor. O tratamento não teve influência sobre os resultados durante o período analisado (F (1,28) = 0.02259; p=0.8827; Figura 6).

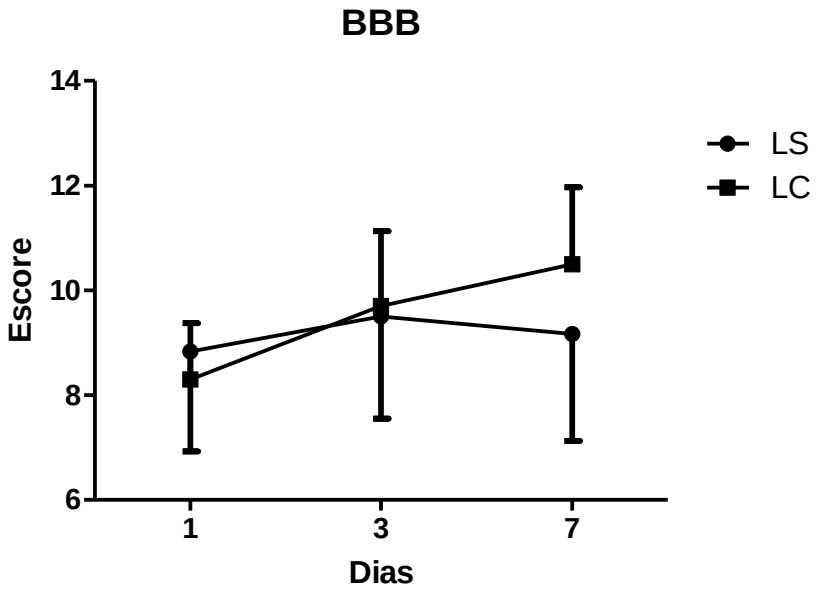

Figura 6. O gráfico mostra o escore do teste BBB em relação aos dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram feitas após o procedimento cirúrgico no 1º,3º e 7º dias. O grupo controle (LS; n=6) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC; n=10) recebeu 200mg/kg de cúrcuma 30 minutos após a cirurgia e diariamente durante todo período experimento. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas mostrou p > 0,05 quando consideradas a interação entre tempo e tratamento e p = 0,0455 quando considerado o tempo do experimento e no pós teste de Bonferroni p>0.05.

A análise da atividade motora espontânea, avaliada pelo teste de Tarlov, não demonstrou influência do tempo ou do tratamento na avaliação da marcha dos animais. Não houve interação entre os grupos e o tempo experimental (F(2,28) = 0.2943; p=0.7474), assim como não houve efeito temporal (F(2,28) = 0.1189; p=

0.8884). O tratamento não influenciou os dados durante o período analisado, (F(1,28) = 0.1051; p = 0.7506; Figura 7).

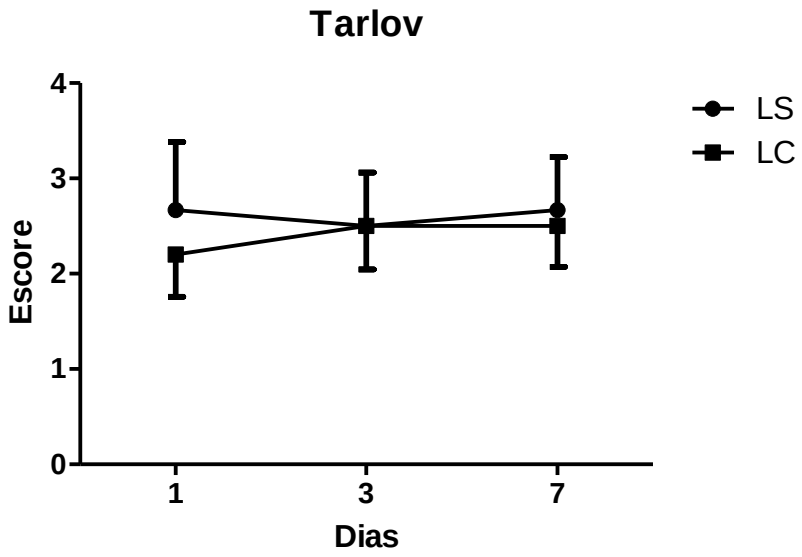

Figura 7. O gráfico mostra o escore do teste de Tarlov em relação aos dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram após o procedimento cirúrgico no 1º, 3º e 7º dias. O grupo controle (LS, n=6) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC, n=10) recebeu 200mg/kg de cúrcuma 30 minutos após a cirurgia e diariamente durante todo período experimento. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas e o Bonferroni pós teste demonstraram p > 0,05 quando considerada a melhora da função motora em relação o efeito temporal.

O reflexo de extensão dos dedos dos pés (REDP) não sofreu influência na interação entre o tempo e do tratamento (F (2,28) = 0.3182; p = 0.7301). No entanto, os efeitos temporais foram significantes (F (2,28) = 3.898; p = 0.0321), podendo indicar uma melhora motora espontânea dos grupos testados. O tratamento não teve efeito sobre o reflexo dos animais (F (1,28) = 0.0625; p = 0.8062; Figura 8).

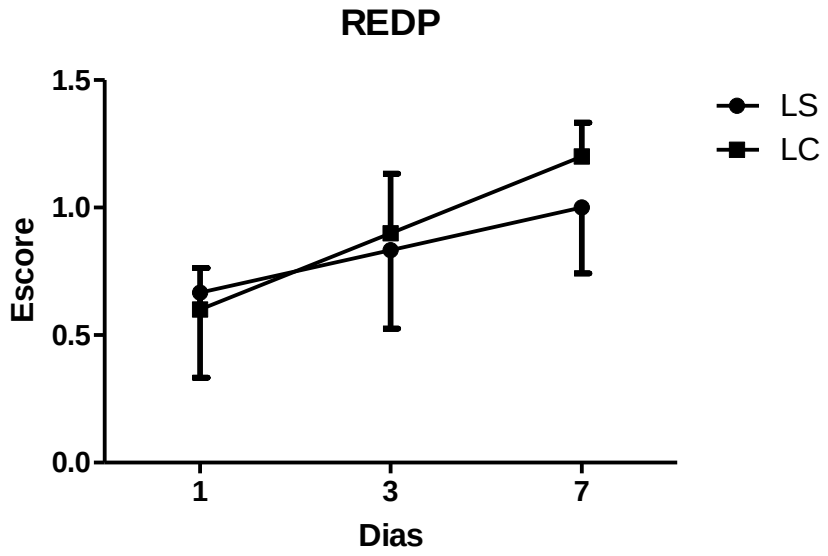

Figura 8. O gráfico mostra o escore do teste de REDP em relação aos dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram após o procedimento cirúrgico no 1º, 3º e 7º dias. O grupo controle (LS, n=6) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC,n=10) recebeu 200mg/kg de cúrcuma 30 minutos após a cirurgia e diariamente durante todo período experimento. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas e o pós teste Bonferroni demonstraram $p > 0.05$ quando considerada a melhora da resposta reflexa em relação o efeito temporal.

A análise dos dados referentes ao reflexo de colocação visual, considerado um reflexo de proteção, não demonstrou interação entre os grupos e o tempo ($F(2,28) = 0.6934$; $p = 0.5083$), assim como não houve efeito temporal ($F(2,28) = 0.6934$; $p = 0.5083$) ou do tratamento durante o período analisado ($F(1,28) = 0.08898$; $p = 0.7699$; Figura 9).

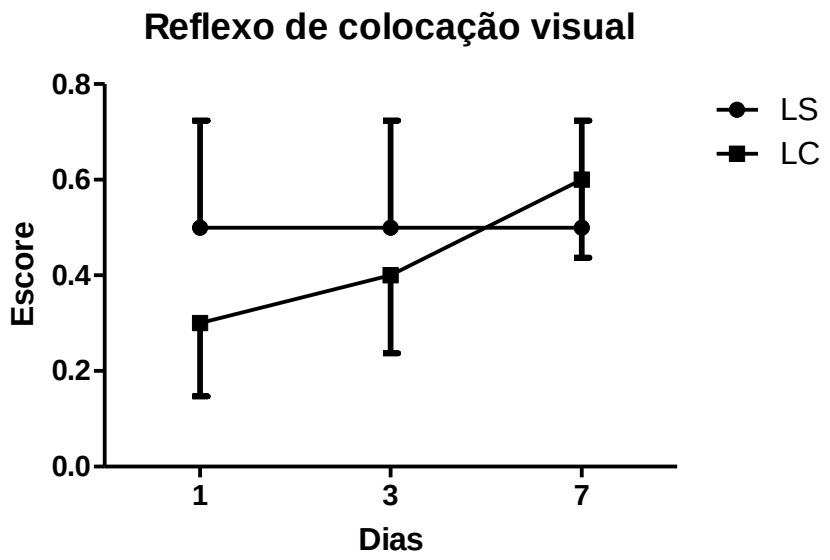

Figura 9**.** O gráfico mostra o escore do teste de reflexo de colocação visual em relação aos dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram após o procedimento cirúrgico no 1º, 3º e 7º dias. O grupo controle (LS; n = 06) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC,n=:10) recebeu 200mg/kg de cúrcuma 30 minutos após a cirurgia e diariamente durante todo período experimento. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas e o Bonferroni pós teste demonstraram $p > 0.05$ quando considerada a melhora da função motora em relação ao efeito temporal.

Nos testes dos reflexos de retirada em resposta ao estímulo de estiramento, tátil ou doloroso (extensão, pressão e dor), considerou-se efeitos da lesão sobre os diferentes lados, uma vez que realizou-se uma hemissecção. Levando-se em conta, inicialmente, os resultados relacionados ao teste do reflexo de extensão, foram realizadas medidas considerando o lado lesionado como situação experimental e o lado contralateral do mesmo animal como o seu controle (Figura 10A). Não houve interação entre tempo e tratamento sobre o reflexo avaliado, bilateralmente ($F(2,20) = 0.07042$; $p = 0.9322$), assim como não houve efeito temporal ($F(2,20) = 1.761$; $p = 0.1976$). Quando comparados os lados lesionados com os lados sãos, evidenciou-se efeito da lateralidade no grupo controle ($F(1,20) = 35.07$) com valores de $p < 0.01$ no 1º e 3º dias de teste e $p < 0.001$ no 7º dia.

Quando considerado o grupo tratado (Figura 10B), a comparação entre os membros demonstrou diferenças. Houve interação entre o tempo e a lateralidade ($F(2,36) = 6.169$; $p = 0.0050$) e efeitos temporais consistentes foram encontrados ($F(2,36) = 6.169$; $p=0,001$). A comparação entre o lado lesionado e o lado contralateral no grupo tratado apresentou diferenças ($F(1,36) = 160.2$; $p < 0.0001$).

Quando comparamos os lados lesionados do LS e do LC, o tempo não teve interação com os efeitos do tratamento ($F(2,28) = 1.345$; $p = 0.2769$). Efeito temporais foram observados ($F(2,28) = 1.345$; $p = 0.0104$), no entanto, não houve influência do tratamento sobre os resultados ($F(1,28) = 0.007848$). O pós teste de Bonferroni o $p > 0.05$ para todas as variáveis analisadas (Figura 10C).

Na análise do teste do reflexo de retirada em resposta à pressão foi feita a comparação dos lados lesionados com o lado contra lateral à lesão. Os resultados representados na figura 11A, que consiste na comparação entre LSD e LSE, o tempo do experimento não teve relação com efeitos do tratamento no grupo controle ($F(2,20) = 0.7090$; $p = 0.5041$). Não houve efeito temporal ($F(2,20) = 0.9328$; $p = 0.4099$) e os efeitos da lesão foram demonstrados ($F(1,20) = 10.52$; $p = 0.0088$). O pós-teste de Bonferroni demonstrou um $p > 0.05$ para o 1º e 3º dias de testes e $p < 0.05$ para o 7º dia indicando diferenças da sensibilidade tátil no animal.

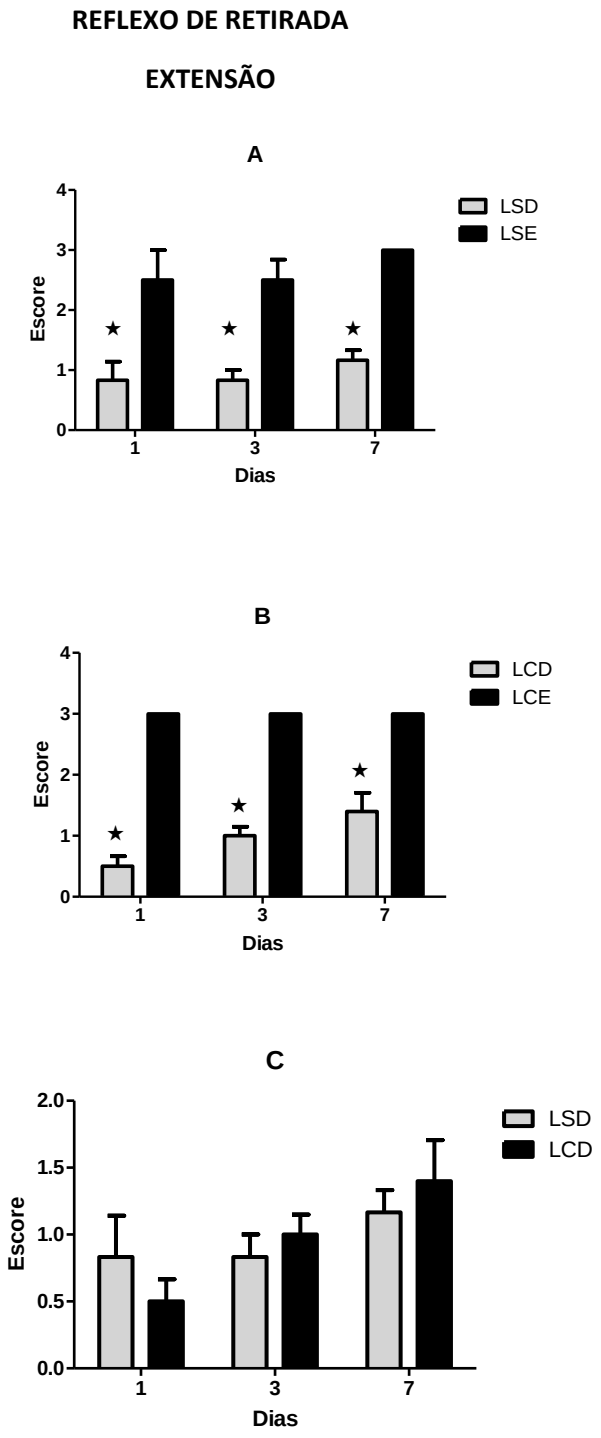

Figura 10. Os gráficos A, B e C mostram média±epm do escore do teste sensório-motor de extensão em relação aos dias de tratamento. O teste de extensão está relacionado a resposta da medula espinhal a uma extensão brusca do fuso muscular. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou, após aplicação do pós teste de Bonferroni, diferenças em A no 1º e 3º dias ($p < 0.01$) e no 7º dia ($p < 0.001$) relacionadas à comparação entre LSD e LSE. Em B, houve diferença entre LCD e LCE ($p < 0.001$) enquanto em C, comparando-se LSD e LCD, não houve diferença ($p > 0.05$). ★=$p<0,05$, comparando-se com lado contralateral (Anova de duas vias). LSD – lado direito lesão sem cúrcuma, LSE – lado esquerdo lesão sem cúrcuma, LCD – lado direito lesão com cúrcuma, LCE – lado esquerdo lesão com cúrcuma.

Ao se comparar o LCD e LCE (grupo tratado – figura 11B) encontramos uma interação entre tempo e o tratamento ($F (2,36) = 6.818$; $p = 0.0031$). O efeito temporal também foi observado ($F (2,36) = 5.182$; $p = 0.0105$) e a lateralidade afetou de forma consistente os resultados ($F (1,36) = 145.2$; $p < 0.0001$). No pós teste de Bonferroni, o 1º dia apresentou $p < 0.01$ e no 3º e 7º dias o $p < 0.001$. Quando comparamos os lados lesionados (figura 10C), LSD e LCD, não encontramos interação entre tratamento e tempo ($F (2,28) = 2.133$; $p = 0.1373$) ou efeito do uso da cúrcuma sobre os resultados nesse teste ($F (1,28) = 0.2889$; $p = 0.5994$). Somente o efeito temporal foi observado ($F (1,28) = 3.411$; $p = 0.0472$; Figura 11C).

Quando consideramos o equilíbrio estático e dinâmico dos animais, podemos observar, através do teste de reflexo de endireitamento, que há uma interação entre o tempo e o tratamento ($F (2,28) = 5.527$; $p = 0.0095$). Não houve efeito do tempo ($F (2,28) = 2.326$; $p = 0.1163$), nem do tratamento sobre o reflexo de endireitamento ($F (1,28) = 0.06387$; $p = 0.8042$; Figura 13).

O teste no plano inclinado não apresentou interação entre os grupos experimentais e o tempo ($F (2,28) = 0.09235$; $p = 0.912$)1. Porém, as demais análises demonstraram melhora em relação ao tempo experimental ($F (2,28) = 16.23$; $p < 0.0001$). O tratamento com a cúrcuma influenciou os dados do teste após 7 dias ($F (1,28) = 10.74$; $p = 0.0055$; Figura 14).

No teste Beam Walking realizamos dois tipos de análise. Inicialmente, considerou-se a melhora do comportamento motor relacionado ao tempo de análise do experimento, sendo aplicado o teste ANOVA bifatorial de medidas repetidas, o qual apresentou interação entre os grupos e o tempo ($F (2,28) = 3.396$; $p = 0.0478$).

Não houve efeito do tratamento ($F(2,28) = 1.045$; $p = 0.365$) ou efeito temporal ($F(1,28) = 0.4099$; $p = 0.5324$; Figura 15).

Quando consideramos dados adicionais extraídos do teste, como quantidade de quedas realizadas pelos animais durante a realização do teste e tempo de execução, no teste ANOVA bifatorial de medidas repetidas obtivemos o resultado relacionado a interação entre grupos ($F(10,126) = 3.968$; $p = 0.0001$), tratamento ($F(2,126) = 203.3$; $p < 0.0001$) e tempo ($F(5,126) = 4.338$; $p = 0.0011$), demonstrando assim uma possível uma melhora dos parâmetros com o passar do tempo e tratamento (Figura 16).

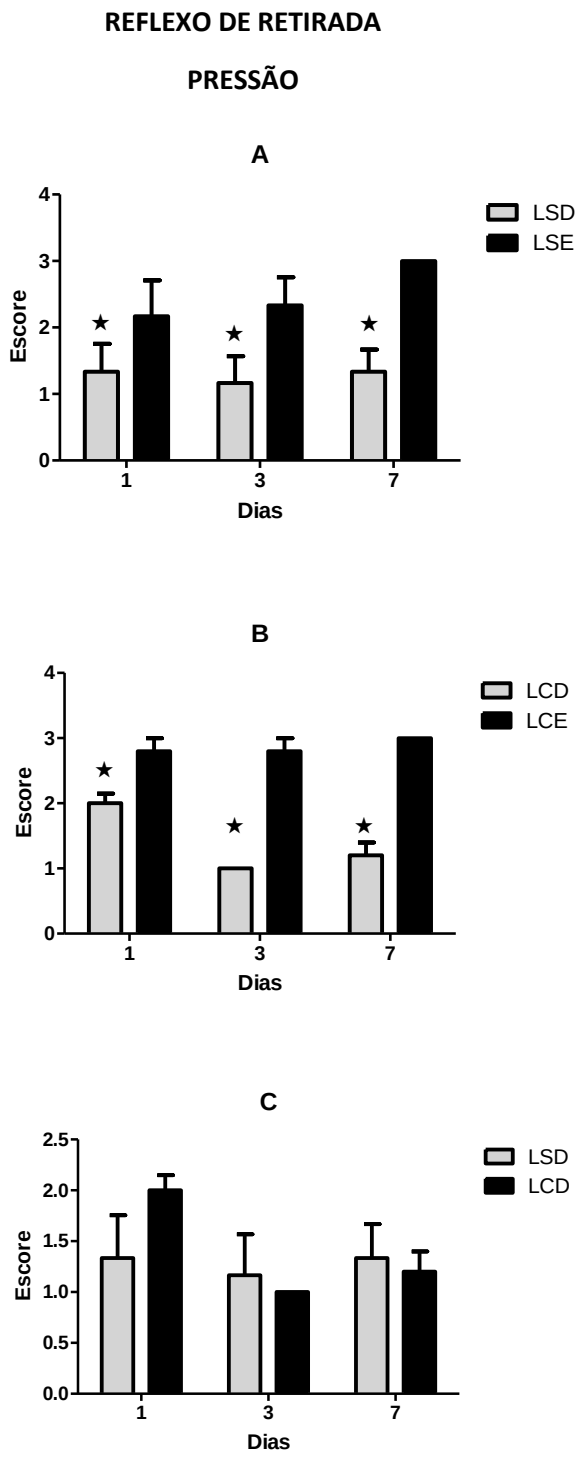

Figura 11. Os gráficos A, B e C mostram média±epm do escore do teste de sensibilidade tátil de pressão. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram após o procedimento cirúrgico, no 1º,3º e 7º dias. O grupo controle (LS) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC) recebeu de cúrcuma. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou, após aplicação do no pós teste de Bonferroni, $p > 0.05$ para o 1º e 3 º dias e $p < 0.05$ somente no 7º dia quando se compara LSD e LSE (A). Em B, a comparação foi realizada entre LCD e LCE e no no 1º dia,$p < 0.01$ e no 3º e 7º dias, $p < 0.001$. Ao se comparar LSD e LCD $p > 0.05$ nos períodos experimentais. ★=p<0,05, comparando-se com lado contralateral (Anova de duas vias). LSD – lado direito lesão sem cúrcuma, LSE – lado esquerdo lesão sem cúrcuma, LCD – lado direito lesão com cúrcuma, LCE – lado esquerdo lesão com cúrcuma.

REFLEXO DE RETIRADA

DOR

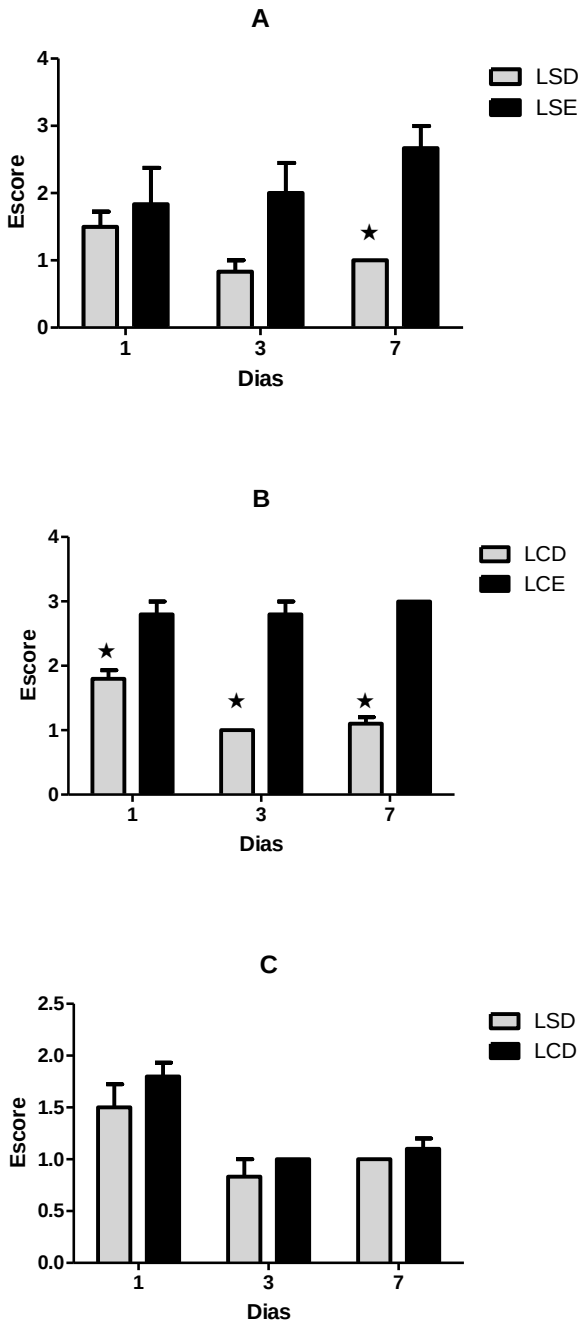

Figura 12. Os gráficos A, B e C mostram média±epm do escore do teste de sensibilidade dolorosa. O grupo controle (LS,n=6) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC,n=10) recebeu 200mg/kg de cúrcuma. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou através do pós teste de Bonferroni $p > 0.05$ para o 1º e 3º dias e $p < 0.01$ somente no 7º dia quando se comparou LSD e LSE (A). Em B, em que a comparação é realizada entre LCD e LCE, o valor no 1º , 3º e 7º dias foi de $p < 0.001$. Ao se comparar LSD e LCD (C) o valor de $p > 0.05$.

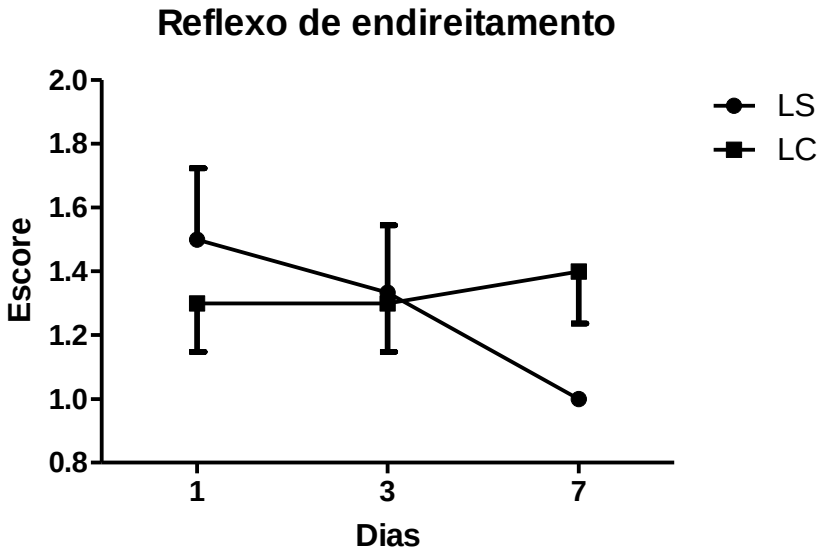

Figura 13. O gráfico mostra a média±epm do escore do teste de reflexo de endireitamento em relação aos dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram após o procedimento cirúrgico no 1º, 3º e 7º dias. Os grupos realizaram laminectomia e lesão à direita, sendo que o grupo controle (LS) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC) recebeu cúrcuma. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou uma interação entre o tratamento e tempo experimental (p = 0.0095).

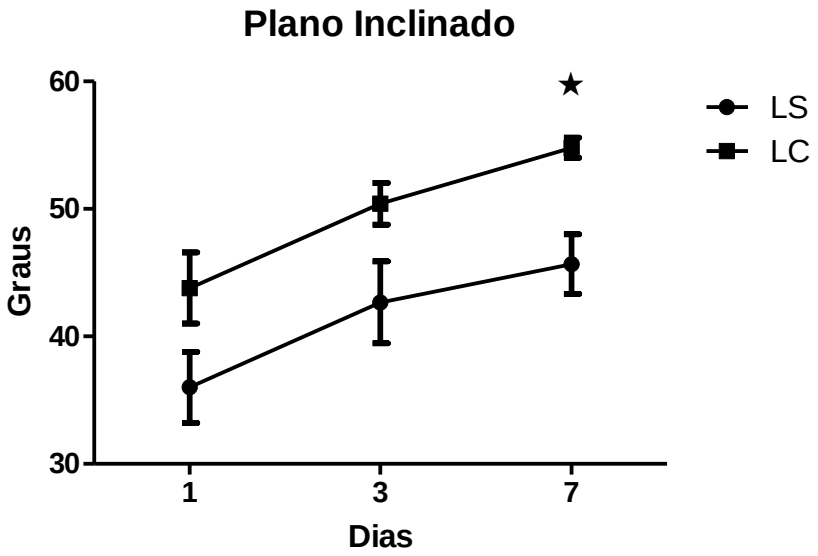

Figura 14. O gráfico mostra média±epm dos graus alcançados pelos animais no plano inclinado em relação aos dias de tratamento. teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou uma interação efeito de 7 dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram após o procedimento cirúrgico no 1º, 3º e 7º dias. Os grupos realizaram laminectomia e lesão à direita, sendo que o grupo controle (LS) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC) recebeu cúrcuma. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou uma interação entre o tratamento e tempo experimental (p = 0.0055).

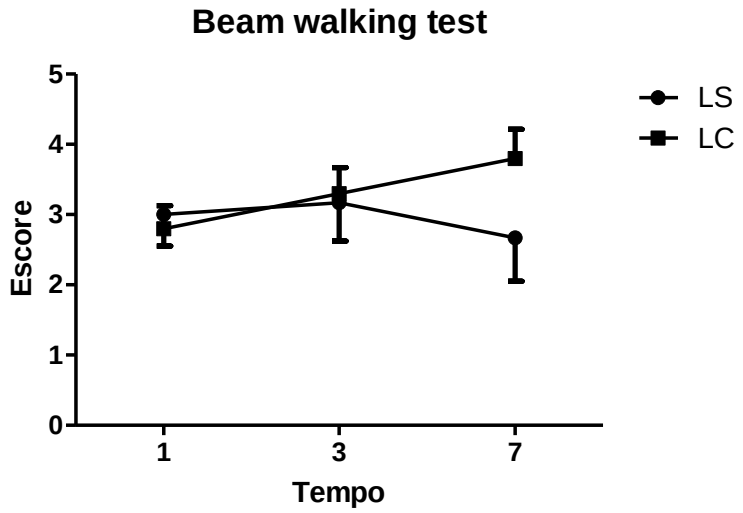

Figura 15. O gráfico mostra a média±epm do escore do Beam Walking Test, que avalia a equilíbrio dinâmico dos animais, relacionado aos dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou uma interação entre o tempo experimetal e o tratamento($p = 0.0478$), quando se avalia tempo e tratamento isoladamente o $p > 0.05$.

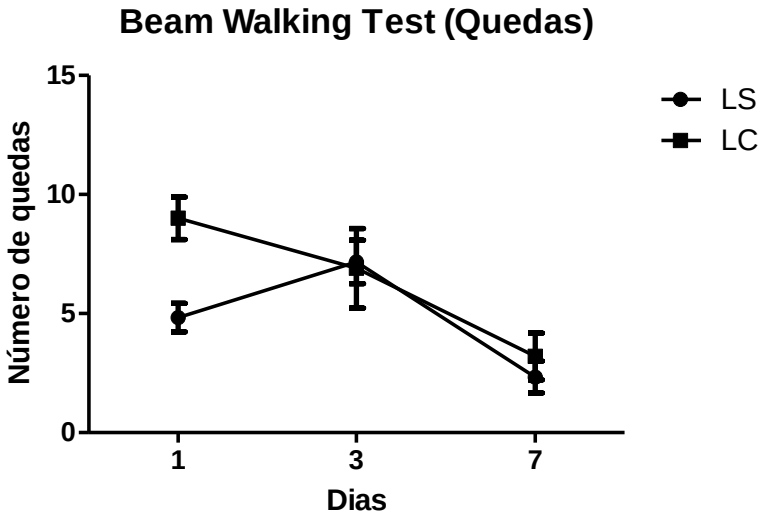

Figura 16. O gráfico mostra a média±epm do escore do Beam Walking Test, que avalia a equilíbrio dinâmico dos animais, relacionado aos dias de tratamento. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita`. Os animais receberam cirurgia de laminectomia e uma hemissecção à direita. As avaliações foram após o procedimento cirúrgico no 1º, 3º e 7º dias. Os grupos realizaram laminectomia e lesão à direita, sendo que o grupo controle (LS) não recebeu tratamento de cúrcuma e o grupo tratado (LC) recebeu cúrcuma. O teste estatístico ANOVA bifatorial de medidas repetidas demonstrou uma interação entre o tratamento e tempo experimental .

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de uma proposta de tratamento não farmacológico sobre o comportamento sensitivo-motor e a recuperação funcional após lesão medular. Considerando os efeitos da cúrcuma sobre várias condições patológicas, elegemos esse princípio para ser utilizado em nossa abordagem experimental.

Quando consideramos os resultados de melhora espontânea obtidos em alguns testes como o BBB (Figura 6), plano inclinado (Figura 14) e REDP (Figura 8), cabe discutir como as vias e tratos anatômicos se reorganizam marginalmente à lesão para restabelecimento da comunicação entre informações periféricas e o SNC. No teste BBB está representada a melhora da função motora em relação aos dias de lesão, considerando que quanto a passagem do tempo é esperado que o escore do animal aumente representando assim que ele teve um melhor desempenho no teste (Basso el al, 1996). Concomitantemente com esses efeitos da melhora da função motora o teste do plano inclinado também poderá apresentar melhora do desempenho dos animais por dois fatores, aprendizagem por repetição da atividade e/ou pela melhora dos reflexos de endireitamento do animal (Rivlin el al, 1977). O trato corticoespinhal é importante na execução da atividade motora, e a melhora funcional evidenciada através dos dias do experimento pode indicar efeitos de plasticidade sobre essa via. Possíveis reconexões podem estar relacionadas com o surgimento de brotamentos colaterais na coluna cervical e lombar após lesões contusas unilaterais na coluna torácica, além de evidências da presença de inúmeros axônios proprioespinhais terminais entre a coluna cervical e a lombar de ratos após 8 semanas de lesão (Bareyre et al., 2004). Entretanto, apesar da

relevância desse último dado, não se pode traçar paralelos lineares entre os achados com o presente estudo por conta dos diferentes tempos experimentais. O trabalho de Bareyre (2004) analisou alterações morfológicas após 8 semanas, enquanto nosso tempo de estudo foi de 7 dias. As respostas motoras obtidas podem apresentar relação com mecanismos de brotamentos que conduziram a uma comunicação entre coluna cervical e lombar em hemissecções da ME. Com 7 dias, alterações morfológicas podem ainda não ter se estabelecido, no entanto, o eventos bioquímicos que envolvem a sinalização celular e tentativas de recuperação funcional podem levar a mudanças no comportamento sensitivo-motor (Gulino et al, 2007).

Como demonstrado por Gulino (2007), alterações sensório-motoras só são evidentes dez dias pós LM. Diferenças na expressão de sintaxina-1, um importante sinalizador de plasticidade que, juntamente com o BDNF age em estruturas suprasegmentares, só inicia após quinze dias, se tornando expressivo após 30 dias de LM. Considerando o tempo de instalação da lesão, a presença de agentes como a cúrcuma pode suprimir a ação da inflamação, diminuindo a expressão de algumas citocinas inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-6 que, consequentemente,Alguns testes comportamentais evidenciaram uma melhora espontânea dos animais. Considerando que a lesão *per si* pode levar a respostas endógenas que busquem a recuperação, eventos pró-inflamatório podem ser peça importante durante esse processo.

Há indícios que o uso de cúrcuma pode diminuir significantemente os níveis dessas citocinas inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-6) na LM, sendo que TNF-α parece desempenhar papel importante nessa cadeia pois, ao ser inibida isoladamente, influencia na diminuição da expressão das demais, demonstrando papel

fundamental nesse mecanismo. Assim, a possível ação da cúrcuma sobre a sinalização da inflamação pode ter influenciado, na presença ou não de melhora da função motora, eventos relacionados com hiperalgia, fenômeno intimamente relacionado com as citocinas citadas anteriormente (Singh et al., 2015).

O BDNF está presente em vários eventos de plasticidade no SNC, com importante função como modulador de excitabilidade neuronal e transmissão sináptica associada a várias proteínas como a CaMKII que, além da sua relação com fatores de transcrição gênica como o CREB, influencia processos da potenciação de longa duração (LTP) envolvidos nos processos morfológicos de aprendizagem e memória (Joseph et al, 2012).

Juntamente com o BDNF, outros fatores neurotróficos (FTN) têm influência nas fases pré e pós da LM: fator de crescimento neural (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) , fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator de crescimento do fibroblasto (FGF), sendo que esses sempre estarão interagindo com a matrix extracelular e, quando integrados, terão papel fundamental na regeneração nervosa pós lesão. Alguns dos efeitos descritos *in vitro* demonstram que os efeitos atrativos ou repulsivos dos FTNs irão depender das moléculas presentes na matriz extracelular, sendo que, dentre os produtos dessa ação conjunta estaria a melhora da sensibilidade, brotamento neurológica, regeneração nervosa, dentre outros, todos influenciados pelo estímulo promovido (Santos et al, 2016; Pinilla et al, 2007). Assim, podemos correlacionar os efeitos acima com os resultados de melhora funcional observados nos testes comportamentais que analisavam a resposta reflexa da ME a estímulos provenientes da periferia (Figura 10,11 e 12).

Como foi observado quando acompanhamos os resultados dos grupos nos testes comportamentais avaliando sensibilidade dolorosa, tátil e o reflexo de retirada

em extensão, os dados demonstraram que o uso da cúrcuma pode ter proporcionado neuroproteção para as vias piramidais do lado contralateral à lesão, pois no grupo LS os resultados indicam que, inicialmente, houve piora funcional e, no sétimo dia, houve uma melhora, provavelmente, relacionada ao efeito temporal (Figura 10B, 11B e 12B). Já no grupo LC, observou-se manutenção das funções sensório-motoras do lado contra lateral a lesão. Como considerado por Singh (2015), que encontrou efeitos da cúrcuma atenuando a hiperalgia, melhorando a defesa antioxidante e inibindo a ação de citocinas pró-inflamatórias após o uso de droga (complexo de Freund adjuvante) para indução de inflamação e hiperalgia. Os possíveis efeitos anti-inflamatórios produzidos pela cúrcuma terão, consequentemente, influência na diminuição do estresse oxidativo, proporcionando um meio mais propício para reorganização tecidual, evitando a formação de cicatriz glial pela diminuição na expressão da proteína fibrilar ácida glial (glial fibrilar acid protein – GFAP), produzida palos astrócitos e envolvida na comunicação celular e no metabolismo celular (Singh et al, 2015; Yuan et al, 2015).

Em relação à plasticidade medular, é necessário citar que o sistema nociceptivo somato-sensorial sofre alterações importantes quando ocorrem lesões no sistema nervoso periférico e/ou central. Esse sistema também apresenta grande capacidade adaptativa com um limiar de alta ativação na ausência de lesão. Contudo, ao ser afetado por infecção, lesão, distúrbios metabólicos ou qualquer estímulo que altere o sistema, pode desencadear processos adaptativos como mudanças plásticas ao longo das vias nociceptivas. A resposta pode vir caracterizada com uma ativação exacerbada da via nociceptiva, podendo causar dor crônica fisiológica, dor patológica caracterizado por uma dor sensorial exacerbada (hiperalgia), limiares rebaixados (alodinia) e persistente ou dor continuada espontânea (Luo et al., 2014).

Considerando a ação dos FNTs e um meio favorável à plasticidade proporcionado pela matriz extracelular, devemos relembrar das funções reflexas da ME com respostas a estímulos táteis, pressóricos, dolorosos e de temperatura independentes da ação suprassegmentar, deflagradas principalmente nas lâminas do corno porterior da ME. Após uma LM, as respostas poderão se apresentar de forma exacerbadas aos estímulos originados na periferia, mecanismo também conhecido como plasticidade mal-adaptativa. Porém, a manutenção dos reflexos medulares pós lesão confirmam a automaticidade da ME e a capacidade de plasticidade. Essa hiperatividade das vias nervosas também está relacionada com as ações das citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α , podendo proporcionar uma hiperalgia. A ação de FNTs, como o BDNF, podem conduzir mecanismos de neuroplasticidade da ME, como os relacionados à LTP, que irão proporcionar uma alteração na conformação das cascatas de despolarização e repolarização dos neurônios marginais a lesão (Santos et al, 2016; Chen et al, 2014; Bareyre et al, 2004). Hemissecções medulares podem gerar efeitos bilaterais acarretando déficits motores mesmo do lado contralateral à LM numa fase aguda, processo relacionado a alterações nos níveis de sintaxina 1 (Gulino et al, 2007). Porém, as eferências suprassegmentares que serão “administradas” pelo lado contraleral à lesão, terão importante papel na comunicação intramedular através dos reflexos medulares e capacidade adaptativa da CPG (Gossard et al, 2015; Gulino et al, 2007). Assim, ao se observar os resultados dos grupos LS e LC nos testes de reflexo de retirada, em que o grupo que não recebeu cúrcuma apresentou maior déficit motor do lado contralateral à lesão mantendo esse padrão até o 7 dia pós lesão, podemos inferir que a cúrcuma proporcionou neuroproteção das vias de controle dessa modalidade sensorial já que o grupo LC não teve piora funcional do lado contralateral quando

considerado o teste de reflexo de retirada em resposta a extensão e, mesmo quando houve perda funcional do lado contralateral nos testes para sensibilidade tátil e dolorosa, apresentou melhora em relação ao tratamento do lado lesionado.

A ação da cúrcuma altera a permeabilidade da BSCB no primeiro e sétimo dias após lesão com utilização de doses de 150 a 300 mg/kg, através da ativação de vias enzimáticas como a da Heme oxigenase 1(HO1), relacionada com a proteção das células no caso estresse oxidativo, levando a efeitos de longo prazo. HO1 tua como supressora da sinalização de TNF-alfa, passando para além da expressão das moléculas de adesão e interleucina- 6 como também produzindo a ROS intracelular e a ativação do NF-KB. Assim, essa indução da proteção da BSCB auxilia na recuperação da função motora (Yu et al, 2014).

Os processos de plasticidade sináptica e de memória de reconsolidação, caracterizados pela reorganização morfológica de mediadores químicos como a CaMKII ou ERK nas vias nociceptivas pós estímulo e LTPs no corno posterior da ME, podem explicar o a resposta ao estímulo doloroso em intervenções medulares (Bonin e Koninck, 2014). Tal dado que corrobora com o achado de melhora da resposta ao reflexo de dor dos animais do grupo LC, que podem ter tido associação das respostas adaptativas presentes na ME e dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento com cúrcuma.

A cúrcuma pode ainda influenciar a metabolização de ácidos graxos da família do ômega-3, como o ácido araquidônico (AA), que não é precisamente um ácido graxo essencial, e sim derivado de um composto dessa cadeia vinda do ALA (Joseph el al, 2012) e é um dos mediadores do processo inflamatório. Pode, ainda, influenciar a conversão do ácido linoleico (ALA) em ácido docosahexaenóico (DHA), mecanismo que pode proporcionar neuroproteção. Assim, na presença de um

processo inflamatório sistêmico, o sistema metabólico buscará fontes para manutenção da homeostase e secreção de citocinas, de forma que o tecido adiposo responde a estímulos proporcionados pelos ácidos graxos. Há evidências de que, além da ação anti-inflamatória, a cúrcuma media efeitos anti-adipogênicos relacionados com via de sinalização canônica e supressão das vias de NF- κβ e MAPK (Siriwardhana et al, 2012) dado que vai ao encontro dos resultados obtidos com os animais do grupo LC, que apresentaram ligeira diminuição de peso no sétimo dia pós-lesão.

6.CONCLUSÃO

A cúrcuma é um composto dietético que apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tendo influência sobre a inflamação na LM após uma hemissecção. Outro efeito terapêutico da cúrcuma é a manutenção da estabilidade de membrana através da influência da metabolização de ácidos graxos, mecanismo que resulta em neuroproteção das vias de sinalização e controle das funções sensório-motoras. As ações anti-inflamatórias e neuroprotetoras da cúrcuma podem ter levado à melhora sensório-motora dos animais submetidos à hemissecção medular. Sua ação parece ter sido local, uma vez que os efeitos identificados foram sobre reflexos de retirada que envolvem, basicamente, controle medular.

Todos esses mecanismo poderão ser a base para a melhora sensório-motora apresentada nas fibras envolvidas a reflexos de retirada, que envolvem basicamente controle medular.

Contudo, análises dos efeitos do tratamento com cúrcuma na plasticidade mediada pelo BDNF após lesão medular, efeitos da cúrcuma sobre a plasticidade sináptica mediada pelo fator de transcrição CREB e da proteína CAMKII correlacionando os dados de recuperação sensório-motora com eventos moleculares relacionados com plasticidade seriam de suma importante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGTHONG, S.; KAEWSEMA, A.; CHAROENSUB, T. Curcumin Ameliorates Functional and Structural Abnormalities in Cisplatin-induced Neuropathy. Exp Neurobiol, v. 24, n. 2, p. 139-45, Jun 2015. ISSN 1226-2560. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113793 >.

AHMAD, W. et al. Effects of novel diarylpentanoid analogues of curcumin on secretory phospholipase A2 , cyclooxygenases, lipo-oxygenase, and microsomal prostaglandin E synthase-1. Chem Biol Drug Des, v. 83, n. 6, p. 670-81, Jun 2014. ISSN 1747-0285. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406103 >.

AYDIN, F.; YILMAZ, E.; SOYLAK, M. Vortex assisted deep eutectic solvent (DES)-emulsification liquid-liquidmicroextraction of trace curcumin in food and herbal tea samples. Food Chemistry, v. 243, p. 442-447, 2017.

BAREYRE, F. M. et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. Nat Neurosci, v. 7, n. 3, p. 269-77, Mar 2004. ISSN 1097-6256. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14966523 >.

BARTANUSZ, V. et al. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. Ann Neurol, v. 70, n. 2, p. 194-206, Aug 2011. ISSN 1531-8249. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674586 >.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. Exp Neurol, v. 139, n. 2, p. 244-56, Jun 1996. ISSN 0014-4886. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654527 >.

BONIN, R. P.; DE KONINCK, Y. A spinal analog of memory reconsolidation enables reversal of hyperalgesia. Nat Neurosci, v. 17, n. 8, p. 1043-5, Aug 2014. ISSN 1546-1726. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24997764 >.

CEMIL, B. et al. Curcumin improves early functional results after experimental spinal cord injury. Acta Neurochir (Wien), v. 152, n. 9, p. 1583-90; discussion 1590, Sep 2010. ISSN 0942-0940. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20535508 >.

CHEN, Y. et al. Persistent beneficial impact of H-reflex conditioning in spinal cord-injured rats. J Neurophysiol, v. 112, n. 10, p. 2374-81, Nov 2014. ISSN 1522-1598. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143542 >.

DE LA TORRE, J. C.; BOGGAN, J. E. Neurophysiological recording in rat spinal cord trauma. Exp Neurol, v. 70, n. 2, p. 356-70, Nov 1980. ISSN 0014-4886. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6933069 >.

FEENEY, D. M.; GONZALEZ, A.; LAW, W. A. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. Science, v. 217, n. 4562, p. 855-7, Aug 1982a. ISSN 0036-8075. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7100929 >.

_____. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. Science, v. 217, n. 4562, p. 855-7, Aug 1982b. ISSN 0036-8075. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7100929 >.

FERGUSON, A. R. et al. A simple post hoc transformation that improves the metric properties of the BBB scale for rats with moderate to severe spinal cord injury. J Neurotrauma, v. 21, n. 11, p. 1601-13, Nov 2004. ISSN 0897-7151. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15684652 >.

FIGUEROA, J. D. et al. Docosahexaenoic acid pretreatment confers protection and functional improvements after acute spinal cord injury in adult rats. J Neurotrauma, v. 29, n. 3, p. 551-66, Feb 2012. ISSN 1557-9042. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21970623 >.

GALE, K.; KERASIDIS, H.; WRATHALL, J. R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. Exp Neurol, v. 88, n. 1, p. 123-34, Apr 1985. ISSN 0014-4886. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3979506 >.

GIROUX, M. C. et al. Physiological, pharmacokinetic and liver metabolism comparisons between 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats under ketamine-xylazine anesthesia. Exp Anim, v. 65, n. 1, p. 63-75, 2016. ISSN 1881-7122. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26489361 >.

GOLUBITSKY, M. et al. Symmetry in locomotor central pattern generators and animal gaits. Nature, v. 401, n. 6754, p. 693-5, Oct 1999. ISSN 0028-0836. DisponÃ-vel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537106 >.

GOSSARD, J. P. et al. Plastic Changes in Lumbar Locomotor Networks after a Partial Spinal Cord Injury in Cats. J Neurosci, v. 35, n. 25, p. 9446-55, Jun 2015. ISSN 1529-2401. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26109667 >.

GULINO, R. et al. Synaptic plasticity modulates the spontaneous recovery of locomotion after spinal cord hemisection. Neurosci Res, v. 57, n. 1, p. 148-56, Jan 2007a. ISSN 0168-0102. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17083989 >.

_____. Synaptic plasticity modulates the spontaneous recovery of locomotion after spinal cord hemisection. Neurosci Res, v. 57, n. 1, p. 148-56, Jan 2007b. ISSN 0168-0102. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17083989 >.

GÃ“MEZ-PINILLA, F. et al. BDNF and learning: Evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression.

Neuroscience, v. 148, n. 4, p. 893-906, Sep 2007. ISSN 0306-4522. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719180 >.

HOLLY, L. T. et al. Dietary therapy to promote neuroprotection in chronic spinal cord injury. J Neurosurg Spine, v. 17, n. 2, p. 134-40, Aug 2012. ISSN 1547-5646. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735048 >.

HOULE, S. K. et al. Publicly funded remuneration for the administration of injections by pharmacists: An international review. Can Pharm J (Ott), v. 146, n. 6, p. 353-64, Nov 2013. ISSN 1715-1635. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24228051 >.

HUANG, W. L. et al. A combination of intravenous and dietary docosahexaenoic acid significantly improves outcome after spinal cord injury. Brain, v. 130, n. Pt 11, p. 3004-19, Nov 2007. ISSN 1460-2156. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901087 >.

JEFFERY, N. D.; BLAKEMORE, W. F. Locomotor deficits induced by experimental spinal cord demyelination are abolished by spontaneous remyelination. Brain, v. 120 (Pt 1), p. 27-37, Jan 1997. ISSN 0006-8950. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9055795 >.

JOSEPH, M. S. et al. Effects of diet and/or exercise in enhancing spinal cord sensorimotor learning. PLoS One, v. 7, n. 7, p. e41288, 2012. ISSN 1932-6203. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911773 >.

KOIZUMI, K. et al. Cytometric analysis on cytotoxicity of curcumin on rat thymocytes: Proapoptotic and antiapoptotic actions of curcumin. Toxicol In Vitro, v. 25, n. 4, p. 985-90, Jun 2011. ISSN 1879-3177. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419841 >.

LIN, C. C. et al. CISD2 serves a novel role as a suppressor of nitric oxide signalling and curcumin increases CISD2 expression in spinal cord injuries. Injury, v. 46, n. 12, p. 2341-50, Dec 2015. ISSN 1879-0267. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26387034 >.

LIN, M. S. et al. Curcumin attenuates the expression and secretion of RANTES after spinal cord injury in vivo and lipopolysaccharide-induced astrocyte reactivation in vitro. J Neurotrauma, v. 28, n. 7, p. 1259-69, Jul 2011. ISSN 1557-9042. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529317 >.

LUO, C.; KUNER, T.; KUNER, R. Synaptic plasticity in pathological pain. Trends Neurosci, v. 37, n. 6, p. 343-55, Jun 2014. ISSN 1878-108X. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833289 >.

MARCOS, A. B. et al. Temporal and Regional Expression of Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide and Its Receptor in Spinal Cord Injured Rats. J Neurotrauma, v. 33, n. 3, p. 261-8, Feb 2016. ISSN 1557-9042. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26421658 >.

ORMOND, D. R. et al. Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. PLoS One, v. 9, n. 2, p. e88916, 2014. ISSN 1932-6203. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24558450 >.

RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. J Neurosurg, v. 47, n. 4, p. 577-81, Oct 1977. ISSN 0022-3085. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/903810 >.

ROY, R. R.; HARKEMA, S. J.; EDGERTON, V. R. Basic concepts of activity-based interventions for improved recovery of motor function after spinal cord injury. Arch Phys Med Rehabil, v. 93, n. 9, p. 1487-97, Sep 2012. ISSN 1532-821X. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920448 >.

SANTOS, D. et al. Preferential Enhancement of Sensory and Motor Axon Regeneration by Combining Extracellular Matrix Components with Neurotrophic Factors. Int J Mol Sci, v. 18, n. 1, Dec 2016. ISSN 1422-0067. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28036084 >.

SHEIKHZADEH, F. et al. Hippocampal BDNF content in response to short- and long-term exercise. Neurol Sci, v. 36, n. 7, p. 1163-6, Jul 2015. ISSN 1590-3478. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25860428 >.

SINGH, A. K.; VINAYAK, M. Curcumin attenuates CFA induced thermal hyperalgesia by modulation of antioxidant enzymes and down regulation of TNF-Î±, IL-1Î² and IL-6. Neurochem Res, v. 40, n. 3, p. 463-72, Mar 2015. ISSN 1573-6903. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25479948 >.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. J Nutr Biochem, v. 24, n. 4, p. 613-23, Apr 2013. ISSN 1873-4847. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498665 >.

TAKIGUCHI, M. et al. Compensatory projections of primary sensory fibers in lumbar spinal cord after neonatal thoracic spinal transection in rats. Neuroscience, v. 304, p. 349-54, Sep 2015. ISSN 1873-7544. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26208841 >.

TOMITA, M. et al. Astrocyte production of the chemokine macrophage inflammatory protein-2 is inhibited by the spice principle curcumin at the level of gene transcription. J Neuroinflammation, v. 2, n. 1, p. 8, Feb 2005. ISSN 1742-2094. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733321 >.

VAZIRI, S.; SERAK, J.; WANG, M. Long-term potentiation of pain "memory" in the spinal cord. Neurosurgery, v. 76, n. 2, p. N14-5, Feb 2015. ISSN 1524-4040. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594198 >.

WANG, Y. et al. Anti-hyperalgesic effect of CaMKII inhibitor is associated with downregulation of phosphorylated CREB in rat spinal cord. J Anesth, v. 25, n. 1, p. 87-92, Feb 2011. ISSN 1438-8359. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188428 >.

WONG, J. K.; STEWARD, O. One day of motor training with amphetamine impairs motor recovery following spinal cord injury. Exp Neurol, v. 233, n. 2, p. 693-707, Feb 2012. ISSN 1090-2430. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078754 >.

WU, A. et al. Brain and spinal cord interaction: a dietary curcumin derivative counteracts locomotor and cognitive deficits after brain trauma. Neurorehabil Neural Repair, v. 25, n. 4, p. 332-42, May 2011. ISSN 1552-6844. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343524 >.

XIE, L.; LI, X. K.; TAKAHARA, S. Curcumin has bright prospects for the treatment of multiple sclerosis. Int Immunopharmacol, v. 11, n. 3, p. 323-30, Mar 2011. ISSN 1878-1705. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828641 >.

YU, D. S. et al. Curcumin improves the integrity of blood-spinal cord barrier after compressive spinal cord injury in rats. J Neurol Sci, v. 346, n. 1-2, p. 51-9, Nov 2014. ISSN 1878-5883. DisponÃvel em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129208 >.